



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

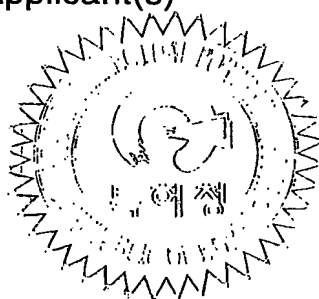
This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0077000
Application Number

출원년월일 : 2003년 10월 31일
Date of Application OCT 31, 2003

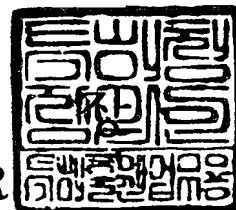
출원인 : 주식회사 렉스진바이오텍
Applicant(s) REXGENE BIOTECH CO., LTD

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 12 월 24 일

특 허 청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003. 10. 31
【발명의 명칭】	이소플라본을 함유하는 과각 추출물의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Preparation method of extract of Sophorae Fructus containing isoflavone
【출원인】	
【명칭】	주식회사 렉스진바이오텍
【출원인코드】	1-1998-101186-9
【대리인】	
【성명】	김석현
【대리인코드】	9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】	2003-064332-1
【대리인】	
【성명】	이희숙
【대리인코드】	9-2002-000221-5
【포괄위임등록번호】	2003-064333-8
【발명자】	
【성명의 국문표기】	권석형
【성명의 영문표기】	KWON, Suk-Hyung
【주민등록번호】	550312-1010611
【우편번호】	137-859
【주소】	서울시 서초구 서초2동 1332 우성아파트 21동 1105호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황보식
【성명의 영문표기】	HWANG, Bo Sik
【주민등록번호】	640205-1788626
【우편번호】	441-704
【주소】	경기도 수원시 권선구 금곡동 엘지빌리지 212-2002
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김국환
【성명의 영문표기】 KIM, Kuk-Hwan
【주민등록번호】 731222-1351127
【우편번호】 361-833
【주소】 충북 청주시 흥덕구 사창동 285-3(상가 6호)
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이승환
【성명의 영문표기】 LEE, Seung-Hwan
【주민등록번호】 731123-1026116
【우편번호】 136-082
【주소】 서울시 성북구 보문2가 33번지 6-6
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 윤은주
【성명의 영문표기】 YOON, Eun-ju
【주민등록번호】 790222-2773110
【우편번호】 300-130
【주소】 대전시 동구 판암동 주공아파트 104동 1306호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이승희
【성명의 영문표기】 LEE, Seung Hee
【주민등록번호】 540510-1056015
【우편번호】 360-776
【주소】 충북 청주시 상당구 울량동 현대1차아파트 403-901
【국적】 KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의
 한 출원심사를 청구합니다. 대리인
 김석현 (인) 대리인
 이희숙 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 4 면 4,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 8 항 365,000 원

【합계】 398,000 원

【감면사유】 중소기업

【감면후 수수료】 199,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 중소기업기본법시행령 제2조에 의
한 중소기업에 해당함을 증명하는 서류[사업자등록증, 원천징수
이행상황신고서]_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 피각을 열수 추출한 후 효소 처리하고 이를 다시 에탄올 추출하는 것을 특징으로 하는 고농도의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 피각 추출물의 제조방법은 이소플라본을 고농도로 함유하는 피각 추출물을 제조할 수 있는 효과가 있으며, 생체 흡수율이 우수한 아글리콘 형태의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물을 제조할 수 있는 효과가 있다.

【대표도】

도 1a

【색인어】

이소플라본, 피각 추출물

【명세서】**【발명의 명칭】**

이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법{Preparation method of extract of Sophorae Fructus containing isoflavone}

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 본 발명의 방법에 따라 제조된 피각 추출물의 이소플라본 함량을 HPLC로 분석한 결과를 나타낸 크로마토그램이다.

도 1b는 본 발명의 방법에 따라 제조된 피각 추출물의 이소플라본 함량을 HPLC로 분석하는데 사용한 표준물질의 크로마토그램이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<3> 본 발명은 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 피각을 열수 추출한 후 효소 처리하고 이를 다시 에탄올 추출하는 것을 특징으로 하는 고농도의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

<4> 이소플라본은 여성 호르몬인 에스트로겐(Estrogen)과 유사한 작용 기작을 가지고 있어 피토에스트로젠(Phytoestrogen)이라 불리며, 골다공증의 예방, 유방암과 전립선암 등에 대한 항암 작

용, 콜레스테롤 저하작용 및 항산화 작용 등 다양한 생리활성 기능이 있는 것으로 보고되고 있다(Toda T. et al., *Food and Development*, 31(6), 44~47, 1996; Murphy P. A., ., 36, 60~64, 1982; Adlercreutz. C. H. et al., *J. Nutr.*, 125(3S), 757~770, 1995).

- <5> 대표적인 이소플라본으로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 등이 있으며, 이들은 주로 콩과 식물, 쑥 및 기타 식물류 등에 존재하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라, 이소플라본을 함유하는 식물 추출물의 제조방법 등이 다양하게 연구되고 있다.
- <6> 이소플라본을 함유하는 식물의 제조방법으로는 대두를 원료로 하는 방법이 가장 많이 연구되어 왔다. 예를 들어, 대한민국특허 제388511호에는 대두를 지방족 알코올 또는 지방족 알코올과 물의 혼합용액으로 추출한 후 농축하고 상기 농축물을 지방족 탄화수소로 처리한 후 지방족 알코올로 재추출하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 대두 추출물의 제조방법이 개시된 바 있으며, 대한민국특허 공개번호 제2001-47621호에는 대두 분쇄물에 헥산을 첨가하여 환류추출함으로써 지질성분을 제거하고 남은 잔사에 메탄올 수용액을 첨가하여 환류추출한 후 여과, 감압농축 및 진공 건조하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 대두 추출물의 제조방법이 개시되어 있다. 한편, 대두 외에 이소플라본의 공급원으로서 갈근 또는 괴화나무의 꽃봉오리가 사용된 바 있다. 대한민국특허 제348148호에는

알코올 수용액에 침지하여 여과 후 동결 건조 한 다음 산 또는 염기로 가수분해하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 갈근 추출물이 개시되어 있으며, 대한민국특허 제380865호에는 회화나무의 꽃봉오리인 피화 건조물을 알코올 수용액으로 추출하거나 또는 피화 건조물을 산 또는 염기 용액으로 가수분해하여 이소플라본을 함유하는 피화 추출물의 제조방법이 개시된 바 있다. 그러나, 상기와 같은 방법에 의해 피화 추출물을 제조하는 경우 제니스테인 함량이 약 9.27mg/kg~약 248.4mg/kg으로 이소플라본이 미량으로 밖에 수득되지 않는 단점이 있다.

- <7> 따라서, 보다 고농도의 이소플라본을 함유하는 추출물을 수득하기 위해서는 새로운 이소플라본의 공급원을 확보하거나 추출하는 방법의 최적화가 요구된다.
- <8> 이에 본 발명자들은 이소플라본의 공급원으로서 회화나무의 열매인 피각을 원료로 하여 이소플라본이 고농도로 추출될 수 있는 일련의 추출 조건을 최적화하고 상기 방법에 의해 고농도의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물을 제조할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <9> 따라서, 본 발명의 목적은 고농도의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <10> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 고농도의 이소플라본을 함유하는
 피각 추출물의 제조방법을 제공한다.
- <11> 보다 구체적으로, (a) 피각에 물을 첨가한 다음 가열하여 열수 추출하는 단계;
- <12> (b) 상기 (a) 단계의 추출액을 냉각 후 여과하여 침전물을 제거하는 단계;
- <13> (c) 상기 (b) 단계의 여과액에 아밀라아제 또는 펙티나아제를 처리하는 단계;
- <14> (d) 상기 (c) 단계의 효소 처리액을 원심분리한 후 침전물을 회수하고 상기 침전물에 에탄올
 을 첨가하는 단계; 및
- <15> (e) 상기 (d) 단계의 에탄올 첨가액을 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계를 포함하는 것을
 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법을 제공한다.
- <16> 본 발명에서 "피각(*Sophorae Fructus*)"은 콩과에 속하는 낙엽교목인 회화나무(*Sophora
 japonica Linne*)의 열매를 말한다. 바람직하게는, 상기 피각은 회화나무의 완숙한 열매를 말
 한다. 본 발명에서 사용되는 피각은 회화나무의 완숙된 열매로서 고유의 색태 및 향미를 가지
 며 이미·이취가 없는 것이 바람직하다. 또한, 과피는 녹갈색 내지 갈색이며 씨는 흑색 내지
 흑갈색인 것이 바람직하다.
- <17> 본 발명자들은 이소플라본의 공급원으로 대두를 대체할 수 있는 천연물질을 찾고자 연구하던
 중 피각 자체에 아글리콘 형태의 이소플라본이 약 29.58g/kg의 고농도로 함유되어 있음을 규명
 하였다(실험예 1 참조). 일반적으로 대두의 경우에는 아글리콘 형태의 이소플라본이 품종에

따라 0.5~1.7g/kg의 농도로 함유되어 있다고 보고된 바 있다(So E. H. et al., ., 33(1), 35 ~39, 2001).

<18> 따라서, 본 발명은 상기와 같이 고농도의 이소플라본을 함유하는 피각을 이소플라본의 새로운 공급원으로 하여 하기에 기재된 바와 같은 최적화된 조건으로 이소플라본이 고농도로 함유하는 피각 추출물을 제조하는 것을 특징으로 한다.

<19> 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다.

<20> 본 발명에 따른 피각 추출물의 제조방법을 단계별로 설명하면 다음과 같다.

<21> 제1단계: 열수 추출

<22> 피각에 물을 첨가한 다음 가열하여 열수 추출한다. 이때, 피각은 수확한 후 세척하여 그대로 사용하거나 건조하여 사용할 수 있다. 피각의 건조는 양건, 음건, 열풍건조 및 자연건조 등의 방법을 사용할 수 있다. 또한, 추출효율을 증대시키기 위해 피각 또는 그 건체를 분쇄기로 분쇄하여 사용할 수 있다. 바람직하게는, 피각의 건체를 10~100mesh, 보다 바람직하게는 20~40mesh의 크기로 분쇄하여 사용한다.

<23> 열수 추출시의 피각과 물의 비율은 특별히 한정되지 않으나, 피각 생체중 1g에 대하여 물을 3배~20배(중량기준)로 첨가한다. 바람직하게는, 피각의 생체중 1g에 대하여 물을 5배~10배(중량기준)로 첨가한다.

- <24> 열수 추출시의 추출온도는 100~130℃, 바람직하게는 120~125℃의 범위에서 수행하며, 추출시 압력은 1.0~2.0kgf/cm², 바람직하게는 1.5~1.6kgf/cm²으로 조절한다.
- <25> 추출시간은 추출온도에 따라 다르지만, 1시간 내지 6시간, 바람직하게는 1시간 내지 3시간 추출한다. 또한, 추출시 교반기(shaker)로 교반할 경우에 더욱 추출효율을 증대시킬 수 있다.
- <26> 제2단계: 열수 추출액의 여과 및 침전물 제거
- <27> 상기 제1단계에서 제조한 열수 추출액을 침전물이 부유하지 않도록 충분히 냉각 한 다음 여과하여 침전물을 제거한다. 열수 추출액의 냉각은 40~60℃, 바람직하게는 50~55℃의 온도가 되도록 수행한다. 냉각한 열수 추출액의 여과는 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 원심분리, 멤브레인 필터 및 여과포를 이용할 수 있다. 바람직하게는, 여과포를 이용하여 여과한다. 가장 바람직하게는 상기 냉각한 열수 추출액을 100mesh 여과포를 사용하여 여과한 후 다시 200mesh 여과포를 사용하여 여과하여 불용성 침전물을 제거한다.
- <28> 제3단계: 효소 처리
- <29> 피각 추출물의 제조시 피각에 포함된 이소플라본을 일반적으로 식물에 존재하는 이소플라본 화합물의 형태인 당과 결합된 배당체 형태(glycoside-type)가 아니라 생체 흡수율이 우수한 당과 분리된 아글리콘 형태(aglycon-type)로 수득하기 위해 상기 제2단계의 여과액에 효소를 처리하여 배당체 형태의 이소플라본을 아글리콘 형태의 이소플라본으로 가수분해한다. 상기 효

소로는 α -아밀라아제(α -amylase), β -아밀라아제(β -amylase) 및 펙티나아제(pectinase)를 사용할 수 있다.

<30> 효소 처리시에는 상기 여과액을 가온하여 효소반응에 적합한 온도가 되도록 한다. 여과액의 온도는 40~60℃, 바람직하게는 52±3℃로 조정한다. 상기 온도를 조정한 여과액에 효소를 0.01~1%(v/v), 바람직하게는 0.1~0.5%(v/v)가 되도록 첨가한다. 상기 효소를 첨가한 여과액을 교반하면서 4~24시간, 바람직하게는 12~16시간 동안 가수분해반응을 수행한다.

<31> 제4단계: 효소 처리액의 원심분리 및 에탄올 추출

<32> 상기 제3단계의 효소 처리액을 즉시 원심분리하여 침전물을 회수한다. 상기에서 회수한 침전물에 에탄올을 첨가하여 이소플라본이 추출되도록 한다. 이는 당이나 단백질 등과 같은 성분들은 에탄올에 녹지 않으나, 아글리콘 형태의 이소플라본은 에탄올에 녹는 특성이 있기 때문에, 상기에서 효소 처리한 후 수득한 침전물을 에탄올 추출함으로써 이소플라본을 더욱 순수한 형태로 수득할 수 있도록 하기 위함이다. 또한, 상기 에탄올은 100% 에탄올과 물을 혼합하여 희석함으로써 80~100%, 바람직하게는 90~95%로 제조한 것을 사용하며, 회수한 상기 침전물에 대해 5~10배가 되도록 첨가한다. 그 후 침전물이 완전히 분산될 때까지 30~60분간 교반한 다음 60~120분간 정치시킨다.

<33> 제5단계: 에탄올 첨가액의 원심분리 및 상등액 회수

- <34> 상기 제4단계의 에탄올 첨가액을 원심분리하여 침전물은 폐기하고 이소플라본이 고농도로 함유된 상등액을 회수한다.
- <35> 상기에서 수득한 상등액은 농축 한 후 분무 건조하여 분말화할 수 있다. 상기에서 농축은 회전식 또는 연속식 농축기를 이용하여 가열함으로써 수행할 수 있다. 농축시 증발된 에탄올은 냉각시켜 회수함으로써 재활용한다. 에탄올이 제거된 농축액을 분무건조기를 이용하여 분무 건조하여 분말화한다.
- <36> 상기 본 발명의 방법에 따라 껍각 추출물을 제조하는 경우, 고농도의 이소플라본을 함유하는 추출물을 수득할 수 있는 효과가 있다.
- <37> 대두 메탄올 추출물의 경우 제니스테인의 함량이 0.1~2.4g/kg이며, 총 이소플라본 함량은 11~12g/kg이 수득되며(대한민국특허 공개번호 제2001-47621호), 무오일 대두 분말 또는 숙성한 통대두의 추출물의 경우 이소플라본 함량이 15~43% (150~430g/kg)으로 수득된다고 개시된 바 있다(대한민국특허 제388511호).
- <38> 이에 비해, 본 발명의 방법에 따라 껍각 추출물을 제조하는 경우에는 총 이소플라본 함량이 876.6g/kg인 껍각 추출물을 수득할 수 있다.
- <39> 따라서, 본 발명의 제조방법은 이소플라본의 공급원으로서 껍각을 사용하여 최적화된 방법에 의해 껍각 추출물을 제조함으로써 종래 방법에 비해 고농도의 이소플라본을 함유하는 껍각 추출물을 수득할 수 있는 우수한 효과가 있다.

<40> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<41> <실시예 1>

<42> 본 발명에 따른 괴각 추출물의 제조

<43> 괴각(제성약품사, 경동시장) 10g을 건식 분쇄기를 이용하여 30mesh의 크기로 분쇄하였다. 상기 분쇄물에 음용수를 첨가하여 10배로 희석한 후(분쇄물:음용수 =9:1) 121℃, 1.5kgf/cm²의 압력 하에서 2시간 동안 가열하였다. 그 후 50℃로 냉각시킨 다음 100mesh의 여과포를 사용하여 여과한 후 다시 200mesh 여과포로 여과하여 침전물을 제거하고 여과액을 수득하였다. 상기 여과액에 0.5%(v/v)의 농도가 되도록 아밀라아제(Pectinase 100L, 노보사)를 첨가하여 50℃에서 16시간 동안 효소반응을 수행하였다. 상기 반응액을 원심분리함으로써 침전물을 회수하고 상기 회수한 침전물에 90% 에탄올을 5배수로 첨가하여 침전물이 완전히 분산될 때까지 30분간 교반하였다. 교반 후 1시간 동안 정치시킨 다음 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 회수하였다. 상기 상등액을 농축기를 이용하여 상등액의 부피가 1/10만큼 줄어들 때까지 농축한 다음 상기 농축액을 분무 건조기로 분말화하여 괴각 추출물 분말 0.3g(괴각 분쇄물에 대한 수율: 3%)을 수득하였다.

<44> <실시예 2>

<45> 본 발명의 방법에 따라 제조된 괴각 추출물의 이소플라본 함량 분석

- <46> 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, 이하 HPLC라 함)를 이용하여 상기 실시예 1에서 제조한 괴각 추출물의 이소플라본 함량을 분석하였다.
- <47> 상기 실시예 1에서 제조한 괴각 추출물 분말 1mg 취하여 100% 메탄올 1ml에 완전히 용해시킨 100배 희석한 후 필터(syringe filter, 0.45 μ m, Waters Korea)를 이용하여 여과한 다음 여액 10 μ l를 취하여 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC 분석 시 컬럼으로는 C18 ODS(150 \times 4.6mm, S-4 μ m, 80A)(YMC Co., Japan)를 사용하였으며, 이동상으로는 1% 아세트산이 첨가되어 있으며 아세트니트릴:물이 20:80의 부피비율로 혼합된 혼합용매로 출발하여 30분 후 1% 아세트산이 첨가되어 있으며 아세트니트릴:물이 40:60의 부피비율로 혼합된 혼합용매로 그래디언트 (gradient)를 수행하였다. 온도는 실온에서 유속 0.8ml/min으로 분석을 수행하였으며, 흡광도를 280nm에서 측정하였다.
- <48> 정량을 위한 표준물질로는 아글리콘 형태인 다이드제인(Daidzein, Sigma, USA), 글리시테인(Glycitein, Sigma, USA) 및 제니스테인(Genistein, Sigma, USA)을 사용하였다.
- <49> 실험 결과, 상기 실시예 1의 괴각 추출물에 함유된 총 이소플라본 함량은 876.6g/kg(87.6%)으로 나타났다(도 1a 및 도 1b).
- <50> 따라서, 본 발명의 방법에 따라 제조된 괴각 추출물에 이소플라본이 매우 고농도로 함유되어 있음을 알 수 있었다.
- <51> <실험예 1>
- <52> 괴각 자체에 함유된 이소플라본 함량 분석

<53> 피각에 함유된 이소플라본 함량을 분석하였다. 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 피각을 열수 추출하여 열수 추출물을 제조한 다음 상기 피각의 열수 추출물 5ml에 4N 염산 5ml를 혼합하고 2시간 동안 100℃ 수욕 상에서 환류냉각하며 산 분해하였다. 산 분해 후 수득한 액을 정용 플라스크에 넣고 메탄올을 첨가하여 총 용액의 부피가 50ml가 되도록 보정하였다(10배 희석). 그 후 상기 용액 10ml를 취하여 메탄올로 100ml가 되도록 보정해 준 후(10배 희석) pH를 4~8로 조절한 후 필터를 이용하여 여과하였다. 상기 여과액을 시료로 사용하여 실시예 2와 동일한 방법으로 HPLC 분석을 수행함으로써 피각에 함유된 아글리콘 형태의 이소플라본 함량을 측정하였다.

<54> 실험 결과, 피각에 함유된 이소플라본의 함량이 29.58g/kg(2.96%)으로 나타났다. 상기 결과로부터 피각에 고농도의 이소플라본이 함유되어 있음을 알 수 있었다.

<55> <실험예 2>

<56> 추출방법에 따른 피각 추출물 내 이소플라본 농도 비교

<57> 이소플라본의 함량이 높은 피각 추출물의 제조를 위한 적합한 추출방법을 확립하기 위해 다양한 추출 방법에 따른 피각 추출물의 이소플라본 함량을 비교하였다. 추출방법으로는 헥산 및 60% 에탄올 용매를 이용한 추출방법, 헥산 및 물을 순차적으로 이용한 추출방법, 에탄올용매만을 이용한 추출방법 및 물만을 이용한 추출방법을 사용하였다.

<58> 2-1) 헥산 및 60% 에탄올을 이용한 피각 추출물의 제조

<59> 상기 실시예 1의 피각 분쇄물 10g에 헥산 100ml 를 첨가하여 2시간 동안 추출함으로써 지질성분을 제거하였다. 상기 추출액을 원심분리하여 침전물을 회수하고 상기 침전물에 60% 에탄올을 100ml 첨가한 후 30분 동안 소니케이션 (sonication)하였다. 상기 추출액을 여과한 후 상등액을 회수하고 동결건조 함으로써 피각 추출물 2.4g을 수득하였다.

<60> 2-2) 헥산 및 물을 이용한 피각 추출물의 제조

<61> 상기 실시예 1의 피각 분쇄물 10g에 헥산 100ml 를 첨가하여 2시간 동안 추출하여 지질성분을 제거하였다. 상기 추출액을 원심분리하여 침전물을 회수한 다음 상기 침전물에 음용수를 10배 부피로 첨가하여 100℃의 온도로 6시간 동안 가열함으로써 열수 추출하였다. 상기 열수 추출액을 여과하여 상등액을 회수하여 동결건조 함으로써 피각 추출물 2.8g을 수득하였다.

<62> 2-3) 60%의 에탄올을 이용한 피각 추출물의 제조

<63> 상기 실시예 1의 피각 분쇄물 10g에 60%의 에탄올을 100ml를 첨가한 후 30분동안 소니케이션 (sonication)하였다. 상기 추출액을 여과한 후 상등액을 회수하고 동결건조 함으로써 피각 추출물 2.5g을 수득하였다.

<64> 2-4) 물을 이용한 괴각 추출물의 제조

<65> 상기 실시예 1의 괴각 분쇄물 10g에 음용수를 첨가하여 10배로 희석한 후(분쇄물:음용수=9:1) 100℃의 온도로 6시간 동안 가열함으로써 열수 추출하였다. 그 후 여과하여 침전물을 제거하고 여과액을 수득함으로써 괴각 추출물 2.6g을 수득하였다.

<66> 2-5) 추출방법에 따른 괴각 추출물의 이소플라본 농도 분석

<67> 상기 실험예 2-1) 내지 2-4)에서 제조한 괴각 추출물의 이소플라본 함량을 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, 이하 HPLC라 함)를 이용하여 분석하였다.

<68> 상기 실험예에서 제조한 괴각 추출물을 실험예 1과 동일한 방법으로 산 가수분해 한 후 실시예 2와 동일한 방법으로 HPLC 분석을 수행하였다.

<69> 실험 결과, 헥산 및 60% 에탄올을 추출용매로 사용한 실험예 2-1)의 경우 총 이소플라본 함량이 2.13%(21.3g/kg)로 정량되었으며, 헥산 및 물을 사용한 실험예 2-2)의 경우에는 총 이소플라본 함량이 2.64%(26.4g/kg)로 정량되었다. 60% 에탄올을 사용한 실험예 2-3)의 경우에는 총 이소플라본 함량이 3.42%(34.2g/kg)로 정량되었으며, 물만을 사용하여 열수 추출한 실험예 2-4)의 경우에는 총 이소플라본 함량이 3.38%(33.8g/kg)로 정량되었다(표 1). 따라서, 에탄올을 사용하여 추출한 경우에 이소플라본 함량이 가장 높게 나타남을 알 수 있었다. 그 다음으

로 열수 추출한 경우의 이소플라본 함량이 높게 나타났으며, 에탄올을 이용한 경우와 큰 차이가 나타나지는 않았다.

- <70> 한편, 껍각을 에탄올 추출한 후 아글리콘 형태로 전환시키기 위한 효소처리 단계를 수행하기 위해서는 상기 에탄올을 모두 제거한 후 효소처리를 해야하는 단점이 있다. 이에 껍각 추출물의 제조를 위해서는 열수 추출하는 방법이 가장 효과적인 방법으로 판단하였다.

<71> 【표 1】

추출방법에 따른 껍각 추출물 내 이소플라본 농도

추출방법	이소플라본 함량(%)			총 이소플라본 농도(%)
	다이드제인	글리시테인	제니스테인	
헥산/60%에탄올	0.02	0.03	2.08	2.13
헥산/물	0.03	0.00	2.61	2.64
60%에탄올	0.00	0.01	3.41	3.42
물	0.00	0.00	3.38	3.38

<72> <실험예 3>

<73> 열수 추출 온도 및 시간에 따른 껍각 추출물 내 이소플라본 함량 비교

- <74> 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 껍각의 열수 추출액을 제조하되 추출온도 및 시간을 달리하였다. 또한, 상기에서 제조한 껍각 추출물을 실험예 1과 동일한 방법으로 산 가수분해 한 후 실시예 2와 동일한 방법으로 HPLC 분석을 수행하였다.

- <75> 실험 결과, 추출 온도가 100℃ 이상인 경우에 총 이소플라본 농도가 높은 것으로 나타났다. 따라서, 바람직한 추출 온도는 100℃~130℃임을 알 수 있었다.

<76> 【표 2】

추출 온도에 따른 피각 추출물의 총 이소플라본 농도	
추출 온도(℃)	총 이소플라본 농도(%)
80	2.8%
90	3.2%
100	3.39%
110	3.41%
120	3.52%
130	3.42%

<77> 또한, 추출시간은 2시간이상인 경우에 총 이소플라본 농도가 높은 것으로 나타났다. 따라서, 바람직한 추출 시간은 2~3시간임을 알 수 있었다(표 3).

<78> 【표 3】

추출 시간에 따른 피각 추출물 내 총 이소플라본 농도	
추출 시간	총 이소플라본 농도(%)
1시간	2.94
2시간	3.42
3시간	3.46
4시간	3.39

<79> <실험예 4>

<80> 효소처리 여부에 따른 피각 추출물 내 아글리콘 형태전환 비교

<81> 효소처리 여부에 따라 피각 추출물 내 배당체 형태의 이소플라본이 아글리콘 형태의 이소플라본으로 전환되는 정도를 조사하였다. 일반적으로 이소플라본을 아글리콘 형태로 전환하기 위

해서는 산 가수분해 방법이 효과적이라 알려져 있으나, 산 가수분해방법은 식품 등에 적용하기에는 유해하기 때문에 본 발명에서는 효소처리 방법을 사용하였다. 또한, 효소처리 방법에 의해 이소플라본이 아글리콘 형태로 전환되는 효율을 산 가수분해 방법과 비교하여 측정하였다.

<82> 효소처리하지 않은 경우의 피각 추출물은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 열수 추출물을 제조하되 열수 추출한 후 여과하여 수득한 여과액에 효소를 처리하지 않았다. 효소 처리한 피각 추출물은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 열수 추출물을 제조하고 아밀라아제를 처리한 후 피각 추출물을 제조하였다. 상기에서 제조한 피각 추출물 내 아글리콘 형태의 이소플라본의 함량은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하였다. 효소처리 여부에 따른 이소플라본의 아글리콘 형태로의 전환율은 상기 실험예 1의 피각 추출물을 산 가수분해한 다음 HPLC로 분석하여 측정한 피각 추출물 내 이소플라본 함량을 100%로 하여 계산하였다.

<83> 실험 결과, 효소 처리한 피각 추출물 내 이소플라본의 아글리콘 형태로의 전환율은 97%로 산 가수분해물과 큰 차이가 나타나지 않았으며, 효소 처리하지 않은 피각 추출물에 비해 그 전환율이 매우 높게 나타남을 알 수 있었다(표 4).

<84> 【표 4】

효소처리 여부에 따른 피각 추출물 내 이소플라본의 아글리콘 형태로의 전환율 비교			
	산가수분해	효소처리	효소처리안함
아글리콘 형태의 이소플라본 함량(%)	100%	97%	5%

<85> <실험예 5>

<86> 에탄올 추출에 따른 껍각 추출물의 이소플라본 함량 비교

- <87> 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 껍각을 열수 추출 및 효소 처리하여 수득한 껍각 추출물에 에탄올 처리 여부에 따른 껍각 추출물의 이소플라본 함량에 미치는 영향을 조사하였다.
- <88> 이를 위해 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 껍각을 열수 추출, 효소 처리 및 에탄올 추출한 다음 상등액을 수득하고 상기 상등액을 농축한 후 분무 건조기로 건조 및 분말화하여 껍각 추출물 분말 0.3g을 제조하였다.
- <89> 또한, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 껍각을 열수 추출 및 효소 처리한 후 수득한 침전물에 에탄올을 처리하지 않고 상기 침전물을 농축한 후 분무 건조기로 건조 및 분말화하여 껍각 추출물 분말 2.4g을 제조하였다.
- <90> 상기에서 제조한 각각의 껍각 추출물의 이소플라본 함량은 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 분석하였다.
- <91> 실험 결과, 에탄올 추출을 수행하지 않은 껍각 추출물에 비해 에탄올 추출한 껍각 추출물의 이소플라본 함량이 더 높게 나타남을 알 수 있었다(표 5).

<92> 【표 5】

에탄올 추출에 따른 껍각 추출물의 이소플라본 함량

	에탄올 추출	에탄올 비추출
이소플라본 함량(%)	87.64%	16.67%

【발명의 효과】

<93> 이상, 상기 실시예를 통하여 설명한 바와 같이 본 발명에 피각 추출물의 제조방법은 이소플라본을 고농도로 함유하는 피각 추출물을 제조할 수 있는 효과가 있으며 생체 흡수율이 우수한 아글리콘 형태의 이소플라본을 함유하는 피각 추출물을 제조할 수 있는 효과가 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

- (a) 피각을 물과 혼합한 다음 가열하여 열수 추출하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 추출액을 냉각 후 여과하여 침전물을 제거하는 단계;
- (c) 상기 (b) 단계의 여과액에 아밀라아제 또는 펙티나아제를 처리하는 단계;
- (d) 상기 (c) 단계의 효소 처리액을 원심분리한 후 침전물을 회수하고 상기 침전물에 에탄올을 첨가하는 단계; 및
- (e) 상기 (d) 단계의 에탄올 첨가액을 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 피각은 분쇄하여 사용하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 열수 추출은 중량을 기준으로 피각에 대해 물을 3~20배로 첨가하여 100~130℃의 온도에서 1~6시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 추출액을 40~60℃로 냉각하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 (c) 단계에서 여과액을 가온하여 40~60℃의 온도가 되도록 조절한 후 아밀라아제 또는 펙티나아제를 0.01~1%(v/v)의 농도로 첨가하여 4~24시간 동안 효소 반응시키는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 (d) 단계에서 중량을 기준으로 침전물에 대해 에탄올을 5~10배로 첨가하여 30~60분 동안 교반 후 60~120분 동안 정치하는 것을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 7】

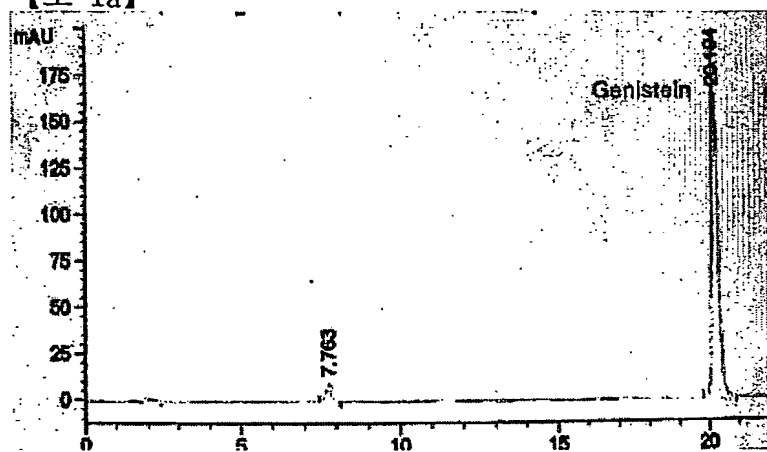
제1항에 있어서, 상기 (e) 단계에서 회수한 상등액을 농축하는 단계를 추가로 포함함을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【청구항 8】

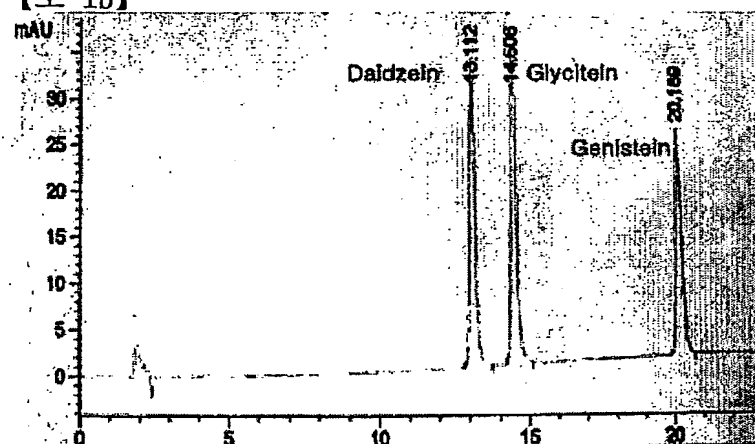
제7항에 있어서, 상기 농축액을 분무건조하여 분말화하는 단계를 추가로 포함함을 특징으로 하는 이소플라본을 함유하는 피각 추출물의 제조방법.

【도면】

【도 1a】



【도 1b】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.